

Karakterisasi Protease Ekstrak Kasar *Bacillus* sp 31

Characterization of Crude Protease Bacillus sp 31

Esti Utarti, Lina Nurita, Sattya Arimurti
Jurusan Biologi FMIPA Universitas Jember

ABSTRACT

Bacillus sp 31 was bacteria which produce protease. Characterization of protease from *Bacillus* sp 31 i.e. pH, temperature, influence of metal ion, enzyme kinetic and enzyme thermostability is important to get optimal enzyme activity. Protease activity showed values 146.40 U/ml on pH 9 and optimal temperature 60°C by value. Protease activity increased by addition of 159.50 U/ml Fe^{2+} , but its activity decreased by addition of Mg^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} , Al^{2+} , Zn^{2+} dan Mn^{2+} . Maximal velocity (V_{max}) of enzyme-catalysed reactions was 21.32 U/ml with K_m 1.5×10^{-3} mg/ml (Michaelis-Menten Kinetic). Protease was very stable at 60°C for 4 hours of incubation and 7 hours of half-time.

Key word : Characterization, protease, *Bacillus* sp 31.

PENDAHULUAN

Protease merupakan enzim yang mengkatalis pemecahan protein, dengan memecah ikatan peptida pada protein sehingga terbentuk asam amino. Saat ini protease dibutuhkan dalam skala tinggi yaitu meliputi dua per tiga dari enzim pasar. Protease banyak dimanfaatkan pada industri makanan maupun non makanan. Kegunaan protease dalam industri berbeda-beda. Dalam industri pembuatan roti, protease digunakan untuk menurunkan kadar protein dalam tepung. Pada industri pembuatan bir, enzim ini digunakan untuk menghilangkan kekeruhan yang terjadi selama penyimpanan bir sedang pada industri tekstil digunakan untuk menghilangkan serabut pada benang kain untuk mencegah kerusakan saat pemintalan (Smith 1995).

Penggunaan protease dalam industri perlu lebih dahulu diketahui kemampuan enzim tersebut. Kemampuan protease dalam mempercepat reaksi dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya adalah faktor pH, suhu (Pelczar 1986) dan logam sebagai aktivator atau inhibitor (Ristiati 2000) yang menyebabkan enzim mempunyai karakter tertentu. Contohnya serin alkalin protease yang dihasilkan oleh *Bacillus mojavensis* stabil pada kisaran pH 7 sampai 11.5, dengan suhu optimum 60°C sampai 70°C serta aktivitas enzim ini meningkat dengan kehadiran ion

Cu^{2+} dan Mn^{2+} (Beg & Gupta, 2002). Sedangkan protease yang dihasilkan oleh *Aspergillus parasiticus* stabil pada kisaran pH 6 sampai 10, aktivitas optimum pada suhu 40°C dan tidak dipengaruhi oleh ion logam seperti Hg^{2+} , Co^{2+} dan Sn^{2+} (Tunga et al. 2003). Tripsin protease yang dihasilkan oleh *Fusarium oxysporum* var. *lin.* stabil pada pH 8, optimum pada suhu 48°C dan aktivitasnya meningkat dengan penambahan ion Ca^{2+} dan Mg^{2+} (Barata et al. 2003).

Kulit buah kakao merupakan limbah perkebunan yang mengandung protein sebesar 18,1% (Arlorio 2001), sehingga dapat digunakan sebagai substrat produksi protease. Penelitian Utarti et al. (2003) menunjukkan bahwa *Bacillus* sp 31 yang diisolasi dari Sumber air panas Maribaya mempunyai kemampuan memproduksi protease dari substrat kulit buah kakao 3%.. Enzim ini bersifat spesifik sehingga untuk mendapatkan aktivitas yang optimal perlu dilakukan karakterisasi terhadap enzim tersebut. Produksi protease ini dilakukan pada suhu kamar menggunakan substrat kulit buah kakao. Karakterisasi protease dilakukan terhadap pH, suhu, pengaruh logam, kinetika enzim dan thermostabilitas enzim. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui karakter protease dari *Bacillus* sp. 31 yang diproduksi menggunakan substrat kulit buah kakao.

METODE

Produksi protease

Peremajaan biakan *Bacillus sp* 31 dilakukan dengan menginokulasikan isolat tersebut pada *Nutrient Agar* miring dan diinkubasi pada suhu 40°C selama 24 jam. Persiapan inokulum dilakukan dengan menginokulasi satu ose *Bacillus sp* 31 pada 10 ml Luria Broth dan diinkubasikan pada suhu 40°C dalam inkubator bergoyang dengan waktu inkubasi 12 jam (Utarti *et al.* 2003). Fermentasi dilakukan dengan menginokulasikan secara aseptis 10% inokulum dalam media produksi (bubuk kulit buah kakao 3% dalam mineral basal) dan diinkubasi pada suhu kamar dengan waktu inkubasi 50 jam pada inkubator bergoyang 120 rpm (Utarti *et al.* 2003).

Ekstraksi protease

Ekstraksi protease dilakukan dengan sentrifugasi media fermentasi pada 7000 rpm suhu 4°C selama 10 menit dimana sebelumnya ditambahkan 0,25 ml Na-asida 10 ppm. Supernatan yang dihasilkan merupakan protease ekstrak kasar.

Karakterisasi protease

Pengujian untuk menentukan karakter protease dilakukan berdasarkan metode Hanlon & Hodges (1981). Pengujian didahului dengan penentuan pH optimum aktivitas protease dan dilanjutkan dengan penentuan suhu optimum pada pH optimum aktivitas protease yang didapatkan. Penentuan pengaruh ion logam, Konstanta Michaels-Menten (Km) dan kecepatan maksimal (Vmaks) serta termostabilitas dilakukan pada pH dan suhu aktivitas protease yang telah didapatkan sebelumnya.

pH optimum

Pengujian pH optimum protease ekstrak kasar dilakukan pada pH 5, 6, 7, 8, 9 dan 10. Satu ml protease ekstrak kasar dihangatkan pada suhu 37°C bersama 3 ml buffer. Buffer yang digunakan adalah buffer sitrat fosfat untuk pH 5 dan 6, buffer fosfat untuk pH 7 dan 8 serta buffer glisin-NaOH untuk pH 9 dan 10. Sebanyak 2 ml larutan azokasein yang dihangatkan pada suhu 37 °C dan diencerkan 2 kali dengan buffer sesuai pH pengujian, selanjutnya ditambahkan 2 ml ke dalam campuran protease dan buffer pH pengujian. Setelah itu diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37°C. Selanjutnya ditambah 4 ml TCA sehingga terbentuk endapan berwarna kuning yang dipisahkan dengan sentrifugasi 6000 rpm selama 10 menit. Kemudian 5 ml filtrat yang terbentuk direaksikan dengan 5 ml NaOH 0,5 M dan diukur absorbansinya pada panjang gelombang 440 nm. Perlakuan ini diulang sebanyak tiga kali. Blanko dilakukan dengan cara menambahkan filtrat sampel setelah penambahan TCA.

Unit aktivitas protease dihitung dengan rumus:

$$U/ml = (\text{absorbansi} : 0,01) \times 2$$

Setelah mendapat hasilnya kemudian membuat kurva hubungan aktivitas protease dengan pH, dan ditentukan pH optimum aktivitas protease.

Suhu optimum

Pengujian untuk menentukan suhu optimum dilakukan pada suhu 40, 50, 60, 70 dan 80°C. Metode pengujian sama seperti pengujian pH optimum dengan menggunakan buffer pH optimum. Setelah mendapat hasil kemudian membuat kurva antara suhu dan aktivitas protease, kemudian ditentukan suhu optimum.

Pengaruh ion logam

Pengujian pengaruh logam dilakukan pada ion logam Mg^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+} , Al^{2+} , Zn^{2+} dan Mn^{2+} dalam garam sulfat. Pengujian dilakukan dengan penambahan 1 mM dan 5 mM garam sulfat yang mengandung ion-ion logam tersebut dengan komposisi 1500 μ L buffer pH optimum dan 1500 μ L ion logam. Sebagai pembanding digunakan buffer tanpa penambahan ion logam (non logam). Pengujian sama seperti pada pengujian penentuan pH optimum dengan menggunakan buffer pH optimum dan pada suhu optimum.

Kinetika enzim

Penentuan kinetika enzim menggunakan larutan azokasein dengan konsentrasi 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,02%, 0,01%, 0,005%, 0,002% dan 0,001%. Metode pengujian sama dengan pengujian untuk penentuan pH optimum dengan menggunakan buffer pH optimum dan suhu optimum aktivitas protease. Kemudian dihitung kecepatan reaksi protease per menit. Selanjutnya dibuat kurva hubungan antara kecepatan reaksi dan konsentrasi substrat azokasein. Setelah itu membuat transformasi Lineweaver-Burk dan menghitung Km dan Vmax.

Termostabilitas enzim

Termostabilitas enzim diuji dengan menginkubasi protease pada suhu optimum aktivitas protease selama 8 jam (Purwadaria, komunikasi pribadi). Pengujian aktivitas protease dilakukan setiap 1 jam sekali dengan cara seperti pada pengujian pH optimum dengan menggunakan buffer pH optimum dan pada suhu optimum. Setelah mendapat hasil kemudian membuat kurva antara waktu dan aktivitas protease.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengaruh pH

Enzim menyediakan banyak tempat untuk pengikatan proton karena enzim adalah protein yang tersusun oleh asam amino yang dapat mengikat proton pada gugus amino, karboksil dan gugus fungsional lain. Gugus fungsional pada sisi aktif yang dapat terionisasi memegang peranan penting pada suatu reaksi

yang dikatalisa oleh enzim (Suhartono 1989). Gugus fungsional tersebut terdapat pada rantai asam amino basa dan asam amino asam (Whitaker 1994).

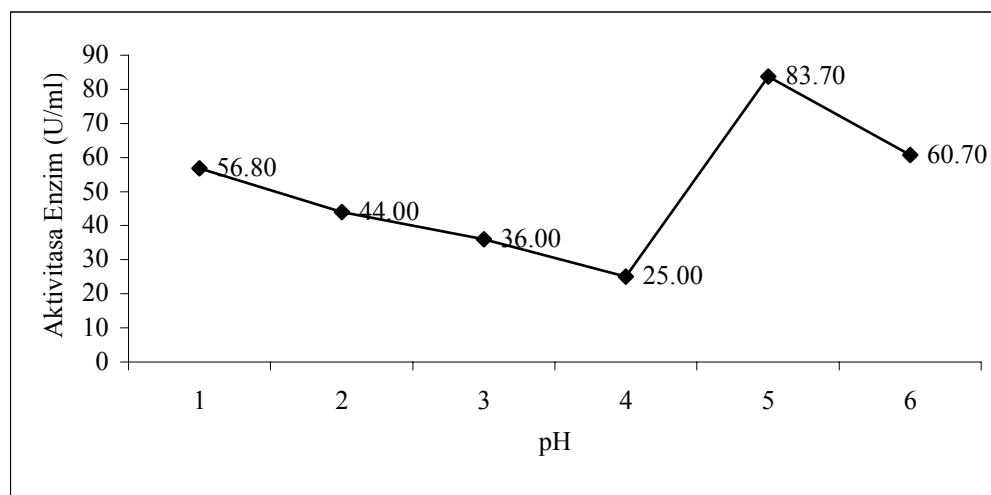
Semua reaksi enzimatik dipengaruhi oleh pH (Suhartono 1989). Hasil uji aktivitas protease dari *Bacillus sp* 31 terhadap pH disajikan pada Gambar 1. Pada gambar tersebut terlihat bahwa pada pH 5 aktivitas enzim sebesar 56.80 U/ml kemudian pada pH 8 mengalami penurunan aktivitas sebesar 25.00 U/ml. Selanjutnya ada pH 9 mengalami peningkatan dengan aktivitas optimum enzim sebesar 83.70 U/ml dan pada pH 10 terjadi penurunan aktivitas enzim sebesar 60.70 U/ml. Berdasarkan hasil diatas protease *Bacillus sp* 31 dapat digolongkan pada alkalin protease karena aktivitas optimum enzim tersebut pada pH basa. Hasil ini hampir sama seperti protease dari *Bacillus sp* APR-4 yang mempunyai aktivitas optimum pada pH 9 (Khumar & Bhalla 2004), sementara serin alkalin protease yang berasal dari *B. subtilis* PE-11 mempunyai aktivitas optimum pada pH 10 (Adinarayana et al. 2003).

Pengaruh suhu

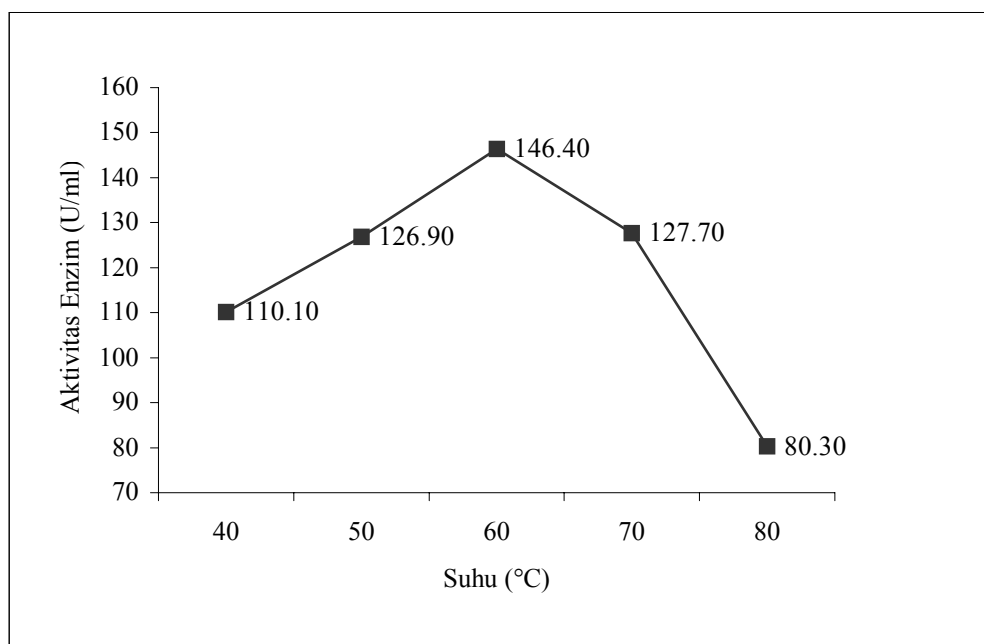
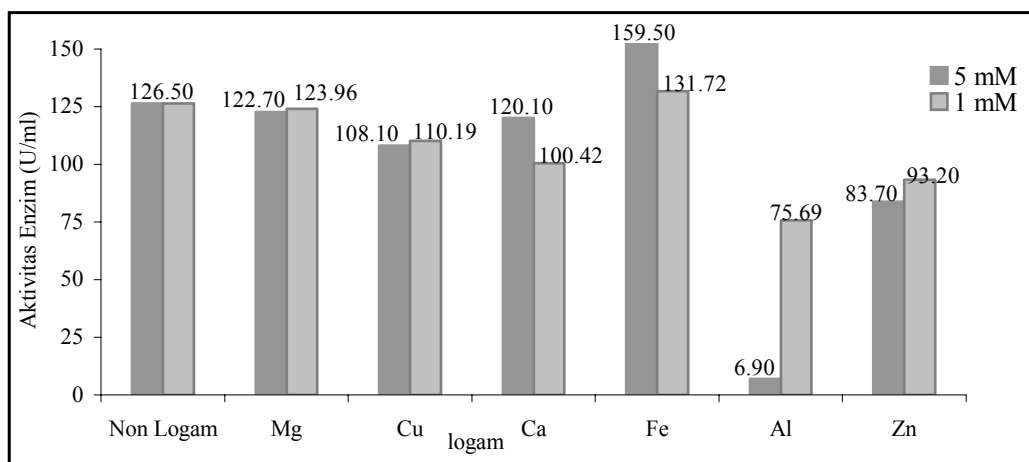
Aktivitas protease dari *Bacillus sp* 31 meningkat seiring dengan bertambahnya suhu dan mencapai optimum pada suhu 60°C dengan aktivitas sebesar 146.40 U/ml selanjutnya pada suhu 70 dan 80°C terjadi penurunan aktivitas

masing-masing dengan aktivitas 127.70 U/ml dan 80.30 U/ml (Gambar 2). Hal ini sesuai dengan pernyataan Pelczar (1986) bahwa aktivitas enzim bertambah dengan naiknya suhu sampai mencapai aktivitas optimum, kemudian kenaikan suhu lebih lanjut berakibat dengan berkurangnya aktivitas enzim. Suhartono (1989) menyatakan bahwa dengan bertambahnya suhu, terjadi kenaikan kecepatan reaksi enzim karena bertambahnya energi kinetik yang mempercepat gerak vibrasi, translasi dan rotasi enzim dan substrat, sehingga memperbesar peluang enzim dan substrat untuk bereaksi. Pada suhu yang lebih besar protein enzim mengalami perubahan konformasi yang bersifat determinal. Pada suhu tinggi, substrat juga mengalami perubahan konformasi sehingga gugus reaktifnya tidak dapat lagi atau mengalami hambatan dalam memasuki sisi aktif enzim.

Aktivitas optimum protease *Bacillus sp* 31 pada suhu 60°C karena asal isolat *Bacillus sp* 31 dari Sumber air panas Maribaya yang mempunyai suhu tinggi. Alkalin protease dari *B. subtilis* PE-11 (Adinarayana et al. 2003), *Bacillus sp* APR-4 (Kumar & Bhalla, 2004) dan *Bacillus sp* B21-2 (Fujiwara & Yamamoto, 1987) yang mempunyai aktivitas optimum pada suhu 60°C. Sementara alkalin protease dari *B. stearothermophilus* AP-4 aktivitas optimumnya terjadi pada suhu 55°C (Dhandapani & Vijayaragavan 1994).



Gambar 1. Pengaruh pH terhadap aktivitas protease *Bacillus sp* 31.

Gambar 2. Pengaruh suhu terhadap sktivitas protease *Bacillus sp 31*.Gambar 3. Pengaruh ion logam terhadap sktivitas protease *Bacillus sp 31*.

Pengaruh ion logam

Kecepatan reaksi enzimatik dipengaruhi juga oleh keberadaan ion logam (Suhartono 1989). Ion logam dapat berfungsi sebagai kofaktor atau inhibitor. Secara kimiawi, suatu kofaktor tidak dapat dibedakan dari inhibitor. Setelah enzim dan substrat berinteraksi, barulah dapat dilihat perbedaannya. Adanya kofaktor yang berikatan dengan enzim dapat menyebabkan kenaikan kecepatan reaksi enzim sedangkan inhibitor jika berikatan dengan enzim

menyebabkan penurunan kecepatan reaksi enzimatik (Whitaker 1994).

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ion logam yang berfungsi sebagai kofaktor protease dari *Bacillus sp 31* adalah ion Fe^{2+} (Gambar 3). Terlihat pada konsentrasi 1 mM ion Fe^{2+} sudah mampu meningkatkan aktivitas protease sebesar 131.72 U/ml kemudian terjadi peningkatan aktivitas enzim yang lebih besar pada konsentrasi 5 mM sebesar 159.50 U/ml. Sedangkan pada perlakuan tanpa penambahan

ion logam aktivitas enzim sebesar 126.50 U/ml. Hal ini berbeda dengan hasil karakterisasi dari Adinarayana *et al.* (2003) bahwa serin alkaline protease dari *B. subtilis* PE-11 kofaktornya adalah ion Ca^{2+} , Mg^{2+} dan Mn^{2+} . Sementara pada protease dari *Bacillus sp* APR-4 kofaktornya adalah ion Ca^{2+} dan ion Cu^{2+} (Kumar dan Bhalla, 2004). Penambahan ion Ca^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+} , Al^{2+} dan Zn^{2+} pada reaksi enzimatis yang dikatalis oleh protease *Bacillus sp* 31 menurunkan aktivitasnya.

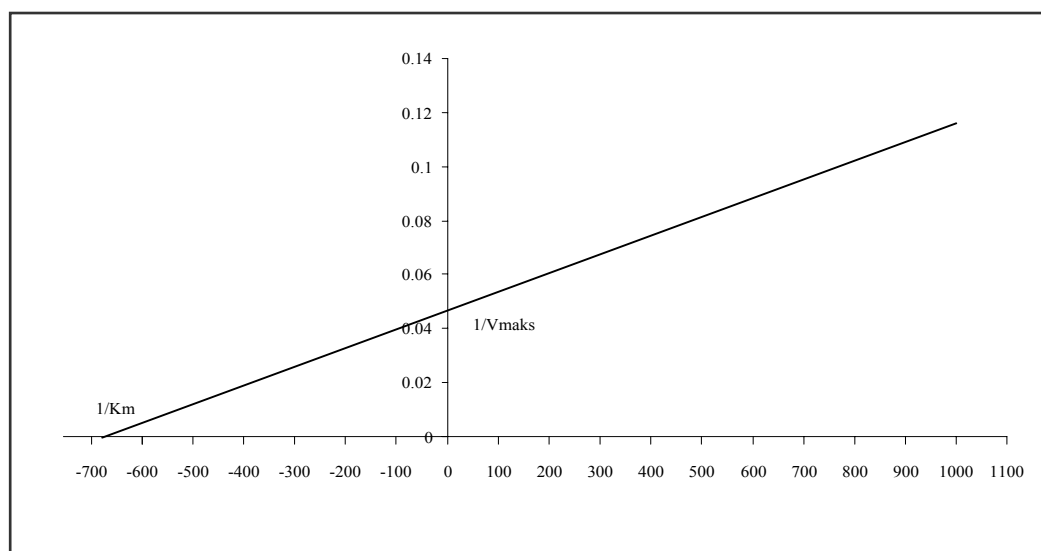
Ikatan kofaktor atau inhibitor dengan enzim dapat mengubah kemampuan enzim dalam mengikat substrat dan juga mengubah kemampuan katalisis enzim. Hal ini disebabkan karena struktur enzim yang sudah berikatan dengan inhibitor atau kofaktor mengalami perubahan fisik dan kimiawi sedemikian rupa, sehingga aktivitasnya pun berubah (Suhartono 1989).

Kinetika enzim

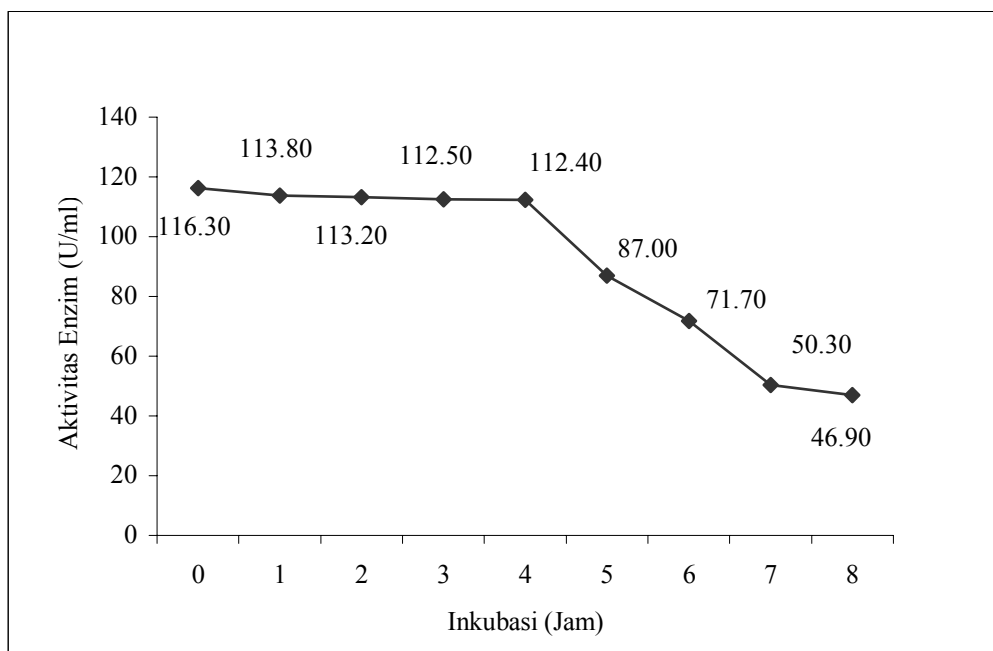
Pembentukan kompleks enzim substrat membatasi kecepatan reaksi enzimatis. Kecepatan maksimum reaksi enzimatis dicapai pada tingkat konsentrasi substrat yang sudah mampu mengubah seluruh enzim menjadi kompleks enzim substrat. Pada konsentrasi substrat di bawah konsentrasi ini, reaksi

enzimatis bergantung pada konsentrasi yang ditambahkan, sedangkan pada konsentrasi substrat di atas konsentrasi tersebut kecepatan reaksi menjadi tidak tergantung pada konsentrasi substrat (Suhartono 1989). Gambar 4 memperlihatkan kecepatan maksimum (V_{maks}) protease dari *Bacillus sp* 31 yaitu 21.32 U/ml. Artinya satu ml enzim dapat menghasilkan produk sebanyak 21.32 unit. Bila dibandingkan dengan serine protease dari *Bacillus sp* APR-4 yang mempunyai V_{maks} 47.60 U/mg (Kumar & Bhalla 2004) kecepatan maksimum protease dari *Bacillus sp* 31 tergolong rendah.

Berdasarkan grafik transformasi Lineweaver-Burk dihasilkan Konstanta Michaelis-Menten (K_m) protease dari *Bacillus sp* 31 adalah 1.5×10^{-3} (Gambar 4). Nilai K_m tersebut termasuk kecil. Menurut Stryer (2000) nilai K_m yang kecil menunjukkan ikatan antara enzim dan substrat kuat dan nilai K_m yang besar menunjukkan ikatan antara enzim dan substrat lemah. Nilai K_m yang kecil tersebut berarti bahwa dengan konsentrasi substrat yang kecil, protease dari *Bacillus sp* 31 sudah dapat mencapai kecepatan maksimum. Hasil ini berbeda bila dibandingkan dengan serine protease dari *Bacillus sp* APR-4 yang mempunyai nilai K_m besar yaitu 26.30 (Kumar & Bhalla 2004).



Gambar 4. Transformasi Lineweaver-Burk protease ekstrak kasar *Bacillus sp* 31.



Gambar 5. Pengaruh lama inkubasi terhadap aktivitas protease *Bacillus sp* 31.

Termostabilitas enzim

Sifat termostabilitas enzim disebabkan oleh daya tahan protein terhadap denaturasi protein oleh pengaruh panas (Lehninger, 1995). Hasil pengujian terhadap termostabilitas enzim menunjukkan bahwa protease dari *Bacillus sp* 31 tetap stabil pada suhu 60°C. Hal ini ditunjukkan pada Gambar 5 bahwa protease pada suhu ini mampu mempertahankan aktivitasnya antara 112.00 sampai 113.00 U/ml selama 4 jam inkubasi. Setelah 5 jam terjadi penurunan aktivitas enzim. Kemudian mencapai waktu paruh setelah 7 jam inkubasi dengan aktivitas enzim 50.30 U/ml (setengah dari aktivitas awal enzim). Dibandingkan dengan serin alkalin protease dari *B. subtilis* PE-11 yang stabil pada suhu 60°C hanya selama 5 jam 50 menit dan mencapai waktu paruh pada 2 sampai 22 menit pada suhu 60°C (Adinaryana, 2003) protease dari *Bacillus sp* 31 mempunyai stabilitas lebih tinggi pada suhu yang sama.

Stabilitas enzim terhadap panas dipengaruhi oleh ukuran dan kompleksitas enzim. Secara umum, enzim yang mempunyai berat molekul berkisar antara 12×10^4 sampai 5×10^5 tersusun oleh rantai polipeptida tunggal dan ikatan disulfida lebih stabil terhadap panas. Semakin besar enzim dan semakin kompleks strukturnya

maka lebih stabil terhadap panas (Whitaker 1994).

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan protease ekstrak kasar hasil produksi *Bacillus sp* 31 mempunyai pH optimum 9 dan suhu optimum 60°C dengan aktivitas 146.40 U/ml. Aktivitas enzim ini meningkat dengan penambahan ion logam Fe^{2+} dengan aktivitas sebesar 159.50 U/ml. Enzim ini dapat menurun aktivitasnya oleh ion logam Mg^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} , Al^{2+} , Zn^{2+} dan Mn^{2+} . Kecepatan maksimal (V_{maks}) reaksi yang dikatalis oleh enzim ini sebesar 21.32 U/ml dengan Ketetapan Michaels-Menten (K_m) sebesar 1.5×10^{-3} mg/ml. Enzim ini stabil pada suhu 60°C selama inkubasi 4 jam dengan waktu paruh 7 jam.

Perlu dilakukan pemurnian protease dari *Bacillus sp* 31 yang diproduksi pada substrat kulit buah kakao 3% untuk mengetahui perbedaan aktivitas enzim antara enzim ekstrak kasar dan enzim yang telah dimurnikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Adinarayana K, Ellaiah P, Prasad DS. 2003. Purification and Partial Characterization of

- Thermostable Serine Alkaline Protease from a Newly Isolated *Bacillus subtilis* PE-11. *AAPS Pharm Scitech* **4**: 56-59
- Arlorio M, Coisson JD, Restani P, Martell A. 2001. Characterization of Pectins and Some Secondary Compounds from *Theobroma cacao* Hulls. *J. Food Sci.* **66**: 651-662
- Barata RA, Andrade MHG, Rodrigues RD, Castro IM. 2003. Purification and Characterization of an Extracellular Trypsin-like Protease of *Fusarium oxysporum* Var. lin. *Bioscience and Bioengineering* **94**: 304-308
- Beg QK & Gupta R. 2002. Purification and Characterization of an Oxidation-stable, Thiol-dependent Serine Alkaline Protease from *Bacillus mojavensis*. *Enzyme and Microbial Technology* **32**: 294-304
- Dhandapani R & Vijayaragavan R. 1994. Production of a Thermophilic Extracellular Alkaline Protease by *Bacillus stearothermophilus* AP-4. *Microbiol Biotechnol* **10**: 33-35
- Fujiwara N & Yamamoto K. 1987. Production of Alkaline Protease in Low-cost Medium by Alkalophilic *Bacillus sp.* and Properties of The Enzyme. *Ferment Technol* **65**: 345-348
- Hanlon G & Hodges NA. 1981. Bacitracin and Protease Production in Relation to Sporulation During Exponential Growth of *Bacillus licheniformis* on Poorly Utilized Carbon and Nitrogen Sources. *Bacteriol* **162**: 427-431
- Kumar D & Bhalla TC. 2004. Purification and Characterization of a Small Size Protease from *Bacillus sp.* APR-4. *Exp Biol* **42**: 515-517
- Lehninger AL. 1995. *Dasar-Dasar Biokimia*. Terjemahan M. Suhartono dari Basic of Biochemistry (1987). Airlangga : Jakarta.
- Pelczar MJ Jr. & Chan ECS. 1986. *Dasar-Dasar Mikrobiologi*. Terjemahan R.S. Hadioetomo, T. Imas dan S.L. Angka dari Elements of Microbiology (1976). Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia.
- Ristiati NP. 2000. *Pengantar Mikrobiologi Umum*. Jakarta: Proyek Pengembangan Guru sekolah Menengah IBRD Loan No 3979.
- Smith JE. 1995. *Bioteknologi*. Edisi Kedua. Terjemahan A. Hartono dari Biotechnology (1988). Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Stryer L. 2000. *Biokimia; Jilid I*. Edisi Empat. Terjemahan M. Shadikin dari Biochemistry (1995). Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
- Suhartono MT. 1989. *Enzim dan Bioteknologi*. Bogor: Departemen Pendidikan Tinggi Pusat Antar Universitas Bioteknologi Institut Pertanian Bogor.
- Tunga R, Shrivastava B, Banerjee R. 2003. Purification and Characterization of a Protease from Solid State Culture of *Aspergillus parasiticus*. *Process Biochemistry* **38**: 1553-1558
- Utarti E, Arimurti S, Sutoyo. 2003. Pemanfaatan Kulit Buah Kakao Sebagai Media Produksi Ekstrak Enzim Protease Asal Bakteri Termofilik. *Saintifika* **4**: 21-28.
- Whittaker JR. 1994. *Principles of Enzymology for The Food Sciences*. Second Edition. New York : Marcek Dekker Inc.